

01/915, 112

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 50 124.9

Anmeldetag: 11. Oktober 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Verwendung der Acetylaminosäureacemase aus
Amycolatopsis orientalis zur Racemisierung von
Carbamoylaminosäuren

IPC: C 12 P 13/04

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 9. Oktober 2001
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Brand

Verwendung der Acetylaminosäureracemase aus Amycolatopsis orientalis zur Racemisierung von Carbamoylaminosäuren

Die vorliegende Erfindung richtet sich auf die Verwendung einer N-Acetylaminosäureracemase (AAR) in einem Verfahren 5 zur Racemisierung von N-Carbamoylaminosäuren.

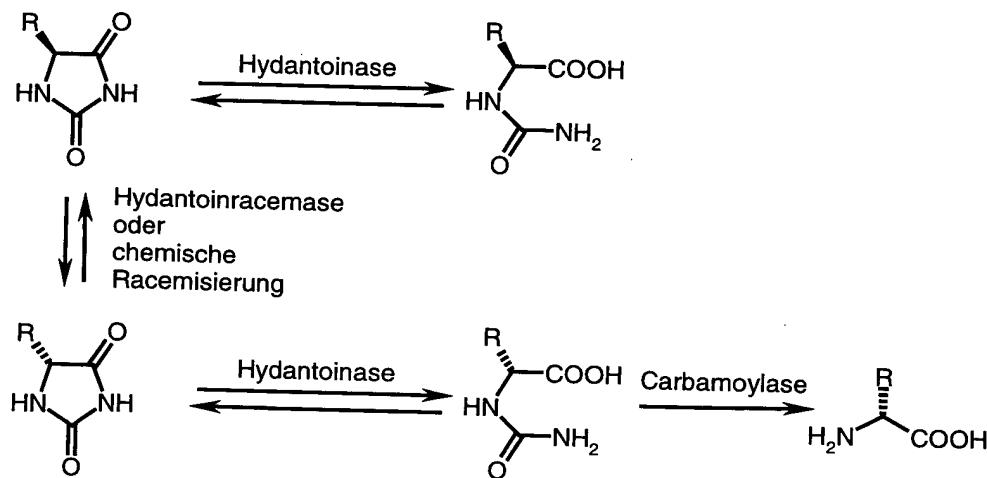
Optisch reine Aminosäuren sind für die chemische Synthese sowie die parenterale Ernährung wichtige Ausgangsstoffe. Zur Herstellung optisch reiner Aminosäuren sind dem Fachmann viele Möglichkeiten bekannt. U.a. bieten sich diesbezüglich enzymatische Verfahren an, da sie zum einen katalytisch 10 arbeiten und zum anderen die Aminosäuren mit sehr hohen Enantiomerenanreicherungen herzustellen gestatten.

Ein bekanntes enzymatisches Verfahren geht dabei von racemischen Hydantoinen aus, welche mittels Hydantoinasen in N-15 carbamoylgeschützte Aminosäuren transformiert werden. Anschließend werden diese durch Carbamoylasen in die Aminosäuren umgesetzt.

Vorzugsweise erfolgt die Trennung der in dieser Reaktionssequenz auftretenden Racemate auf der Basis der N-20 carbamoylgeschützten Aminosäuren, da sowohl L- als auch D-selektive Carbamoylasen zur Verfügung stehen (Park et al., Biotechnol. Prog. 2000, 16, 564-570; May et al., Nat Biotechnol. 2000, 18, 317-20; Pietzsch et al., J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 2000, 737, 179-86; Chao et al., Biotechnol. Prog. 1999, 15, 603-7; Wilms et al., J. Biotechnol. 1999, 68, 101-13; Batisse et al., Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63, 763-6; Buson et al., FEMS Microbiol. Lett. 1996, 145, 55-62).

Um einen vollständigen Umsatz der eingesetzten Hydantoin 30 in optisch reine Aminosäuren zu gewährleisten, geschieht die dazu notwendige Racemisierung bisher auf der Basis der Hydantoin in chemischer oder enzymatischer Art und Weise (EP 745678; EP 542098; Schema 1).

Schema 1:



5 Aus *Streptomyces atratus* Y-53 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 40, 835-840) und *Amycolatopsis* sp. TS-1-60 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995a, 42, 853-859) sowie *Amycolatopsis orientalis* sp. *lurida* (DE19935268) sind N-Acetylaminosäureracemaseren (AARS) bekannt. Von der TS-1-60 ist eine allerdings sehr geringe 10 Aktivität bei N-carbamoylgeschützten Aminosäuren feststellbar. Darüberhinaus besitzt dieses Enzym den Nachteil einer sehr hohen Metallionenabhängigkeit, was für den Einsatz dieses Enzyms in einem großtechnischen Prozeß nachteilig erscheint.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, die Verwendung einer N-Acetylaminosäureracemase zur gegenüber dem Stand der Technik verbesserten Racemisierung von N-Carbamoylaminosäuren anzugeben. Diese Racemase sollte in einem Verfahren zur Herstellung von optisch reinen Amino- 20 säure ausgehend von racemischen Hydantoinen großtechnisch vorteilhaft einsetzbar sein.

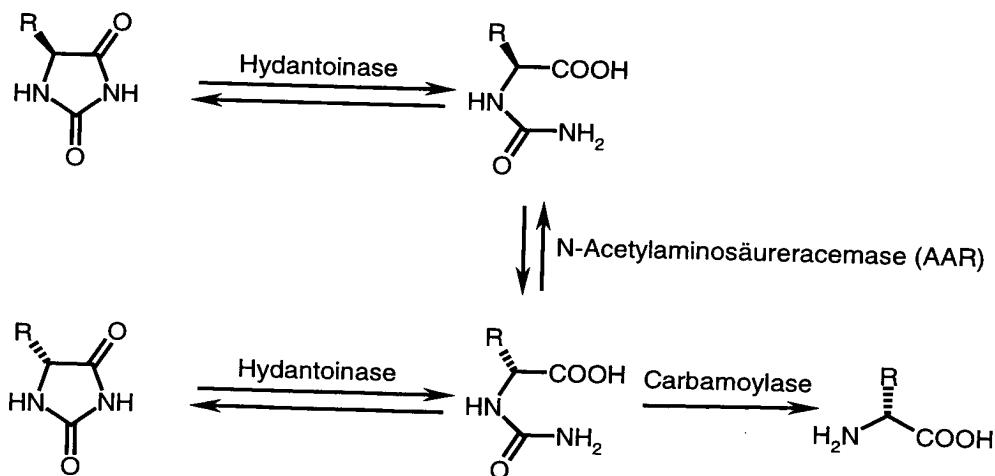
Gelöst wird diese Aufgabe durch die Verwendung der AAR gemäß Anspruch 1. Ansprüche 2 und 3 richten sich auf bevor-

zugte Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Racemisierungsverfahrens.

Dadurch, daß man in einem Verfahren zur Racemisierung von N-Carbamoylaminosäuren eine N-Acetylaminosäureracemases 5 (AAR) aus *Amycolatopsis orientalis* subspecies *lurida* (Seq. 2) verwendet, erhält man aufgrund der überraschend erhöhten Aktivität der erfindungsgemäß eingesetzten AAR gegenüber der TS-1-60 im Hinblick auf die Racemisierung von N-Carbamoylaminosäuren die Möglichkeit, in einem verbesserten 10 Verfahren die Äquilibrierung optischer Antipoden von N-carbamoylgeschützten Aminosäuren zu vollziehen.

Dies ist vor dem Hintergrund besonders vorteilhaft, daß man somit einen weiteren enzymatischen Schritt in einem Verfahren zur Herstellung von optisch reinen Aminosäuren etablieren kann, welches von Hydantoinen ausgeht (Schema 2). 15

Schema 2:



Gegenüber den literaturbekannten enzymatischen Verfahren, welche über eine enzymatische oder ggf. stressende chemische Racemisierung der Hydantoinen prozessieren (Schema 1), hat man somit eine weitere vorteilhafte Möglichkeit geschaffen, aus racemischen Hydantoinen optisch reine Aminosäuren zu generieren. 20

Vorzugsweise wird für das Racemisierungsverfahren die rekombinant hergestellte Variante der AAR aus Amycolatopsis o. sp. lurida gemäß DE19935268 eingesetzt. Aus der DE19935268 ist bekannt, daß diese eine verhältnismäßig geringe Schwermetallionenabhängigkeit (insbesondere in Bezug auf Kobaltionen) und geringe Aminosäureinhibierung aufweist. Dort wird auch deren Generierung als rekombinantes Enzym erläutert.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird wie gesagt in einem Gesamtprozeß zur Herstellung von enantiomer angereicherten Aminosäuren oder deren Derivaten ausgehend von Hydantoinen oder N-Carbamoylaminosäuren vorteilhaft eingesetzt. Man geht dabei im Falle der Hydantoin bevorzugt so vor, daß man racemische Hydantoin mittels Hydantoinasen in die korrespondierenden racemischen N-Carbamoylaminosäuren spaltet und diese anschließend durch L- oder D-spezifische Carbamoylasen in die optisch aktiven L- oder D-Aminosäuren umwandelt. Damit sich nicht die nicht umgesetzte optische Antipode einer N-Carbamoylaminosäure im Reaktionsgemisch anreichert, setzt man die optischen Antipoden der N-Carbamoylaminosäuren durch Zugabe der AAR erfindungsgemäß ins Gleichgewicht und kann somit ebenfalls das racemische Hydantoin zur Gänze in optisch reine Aminosäuren umwandeln.

Vorzugsweise erfolgt dieser Prozeß in einem Enzym-Membran-25 Reaktor (DE 199 10 691.6).

Die genannten Enzyme können in freier Form als homogen aufgereinigte Verbindungen oder als rekombinant hergestellte Enzyme zusammen oder nacheinander verwendet werden. Weiterhin können die Enzyme auch als Bestandteil eines Gastorganismus (Ganzzellkatalysator wie in US09/407062) eingesetzt werden oder in Verbindung mit der aufgeschlossenen Zellmasse des Wirtsorganismus. Möglich ist ebenfalls die Verwendung der Enzyme in immobilisierter Form (Bhavender P. Sharma, Lorraine F. Bailey and Ralph A. Messing, "Immobilisier-

te Biomaterialiern - Techniken und Anwendungen", Angew. Chem. 1982, 94, 836-852). Vorteilhafterweise erfolgt die Immobilisierung durch Lyophilisation (Dordick et al. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 5009-5010; Okahata et al. Tetrahedron Lett. 1997, 38, 1971-1974; Adlercreutz et al. Biocatalysis 1992, 6, 291-305). Ganz besonders bevorzugt ist die Lyophilisation in Gegenwart von oberflächenaktiven Substanzen, wie Aerosol OT oder Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenglycol (PEG) oder Brij 52 (Diethylenglycol-monocetylether) (Goto et al. Biotechnol. Techniques 1997, 11, 375-378).

Der Mikroorganismus Amycolatopsis orientalis subsp. lurida ist unter der Nummer DSM43134 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen hinterlegt.

15 Unter AAR wird im Rahmen der Erfindung sowohl das native wie auch das rekombinant hergestellte Enzym verstanden.

Der Begriff enantiomer angereichert bezeichnet das vorliegen einer optischen Antipode im Gemisch mit der anderen in >50%.

20 Unter Aminosäure wird im Rahmen der Erfindung eine natürliche oder unnatürliche α -Aminosäure verstanden, d.h. daß der am α -C-Atom der α -Aminosäure befindliche Rest sich von einer natürlichen Aminosäure, wie in Beyer-Walter, Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 22.

25 Auflage, 1991, S.822f. dargestellt, ableiten kann oder darüberhinaus auch von entsprechenden α -Resten unnatürlicher α -Aminosäuren, welche z.B. in DE19903268.8 aufgeführt sind.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Verwendung einer Acetylaminosäureracemase zur
Racemisierung von Carbamoylaminosäuren

<130> 000337 AM

10 <140>
<141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1107

<212> DNA

20 <213> Amycolatopsis orientalis

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1107)

25 <400> 1

gtg aaa ctc agc ggt gtg gaa ctg cgc cgg gtc cggtatg ccgttcgtg 48
Val Lys Leu Ser Gly Val Glu Leu Arg Arg Val Arg Met Pro Leu Val
1 5 10 15

30

gcc ccg ttc cgg acg tcg ttc ggg acg cag tcc gag cgg gaa ttg ctg 96
Ala Pro Phe Arg Thr Ser Phe Gly Thr Gln Ser Glu Arg Glu Leu Leu
20 25 30

35

ctg gtc cgc gcg gtg acc ccg gcg ggc gag ggc tgg ggc gaa tgt gtc 144
Leu Val Arg Ala Val Thr Pro Ala Gly Glu Gly Trp Gly Glu Cys Val
35 40 45

40

gcg atg gag gcg ccg ctc tac tcg tcg gag tac aac gac gcc ggc gag 192
Ala Met Glu Ala Pro Leu Tyr Ser Ser Glu Tyr Asn Asp Ala Ala Glu
50 55 60

45

cac gtg ctg cgg aac cat ctg atc ccc gca ctg ctg gcg gcc gag gac 240
His Val Leu Arg Asn His Leu Ile Pro Ala Leu Leu Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80

50

gtg acc gcg cac aag gtg acg ccg ttg ctg gcg aag ttc aag ggc cac 288
Val Thr Ala His Lys Val Thr Pro Leu Leu Ala Lys Phe Lys Gly His
85 90 95

55

cgg atg gcg aag ggc gcg ctg gag atg gcg gtc ctc gac gcc gaa ctc 336
Arg Met Ala Lys Gly Ala Leu Glu Met Ala Val Leu Asp Ala Glu Leu
100 105 110cgc gcg cat gac cgg tcc ttc gcg gcc gag ctg ggg tcc act cgc gac 384
Arg Ala His Asp Arg Ser Phe Ala Ala Glu Leu Gly Ser Thr Arg Asp
115 120 125

tcc gtg gcc tgc ggg gtc tcg gtc ggg atc atg gac tcg atc ccg cac 432

	Ser Val Ala Cys Gly Val Ser Val Gly Ile Met Asp Ser Ile Pro His	
	130 135 140	
5	ctg ctc gac gtc gtc ggc ggc tac ctc gac gag ggc tac gtc cgg atc Leu Leu Asp Val Val Gly Gly Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Val Arg Ile 145 150 155 160	480
10	aag ctg aag atc gag ccc ggc tgg gac gtc gag ccg gtc cgg cag gtg Lys Leu Lys Ile Glu Pro Gly Trp Asp Val Glu Pro Val Arg Gln Val 165 170 175	528
15	cgt gag cgc ttc ggt gac gac gtg ctg ctg cag gtc gac gcg aac acc Arg Glu Arg Phe Gly Asp Asp Val Leu Leu Gln Val Asp Ala Asn Thr 180 185 190	576
	gcg tac acg ctg ggc gac gcg ccc ctg ctg tcc ccg ctc gac ccg ttc Ala Tyr Thr Leu Gly Asp Ala Pro Leu Leu Ser Arg Leu Asp Pro Phe 195 200 205	624
20	gac ctg ctg atc gag cag ccg ctc gaa gaa gag gac gtg ctc ggc Asp Leu Leu Ile Glu Gln Pro Leu Glu Glu Asp Val Leu Gly 210 215 220	672
25	cac gcc gag ctg gcc aag cgg atc ccg acg ccg atc tgc ctc gac gag His Ala Glu Leu Ala Lys Arg Ile Arg Thr Pro Ile Cys Leu Asp Glu 225 230 235 240	720
30	tcg atc gtc tcg gcc aag gcc ggc gac gcg atc aag ctc ggc gcc Ser Ile Val Ser Ala Lys Ala Ala Asp Ala Ile Lys Leu Gly Ala 245 250 255	768
35	tgc cag atc gtc aac atc aaa ccg ggc ccg gtc ggc gga tac ctc gaa Cys Gln Ile Val Asn Ile Lys Pro Gly Arg Val Gly Gly Tyr Leu Glu 260 265 270	816
	gcc cgc cgg gtg cac gac gtc tgc gcg gca cac ggg atc gcg gtg tgg Ala Arg Val His Asp Val Cys Ala Ala His Gly Ile Ala Val Trp 275 280 285	864
40	tgc ggc ggg atg atc gag acc ggg ctc ggc ccg gcg gcc aac gtc gca Cys Gly Gly Met Ile Glu Thr Gly Leu Gly Arg Ala Ala Asn Val Ala 290 295 300	912
45	ctg gcc tcg ctg ccc ggc ttc acg ctg ccg ggg gac acc tcg gcg tcc Leu Ala Ser Leu Pro Gly Phe Thr Leu Pro Gly Asp Thr Ser Ala Ser 305 310 315 320	960
50	ggc cgg ttc tat cgc acc gac atc acc gag ccg ttc gtc ctg gac gcc Gly Arg Phe Tyr Arg Thr Asp Ile Thr Glu Pro Phe Val Leu Asp Ala 325 330 335	1008
55	ggg cat ctg ccg gtg ccg acc ggg ccg ggc ctc ggg gtg act ccg att Gly His Leu Pro Val Pro Thr Gly Pro Gly Leu Gly Val Thr Pro Ile 340 345 350	1056
	ccg gat ctt ctg gac gag gtc acc acg gag aaa gcg tgg atc ggt tcg Pro Asp Leu Leu Asp Glu Val Thr Thr Glu Lys Ala Trp Ile Gly Ser 355 360 365	1104

tag

1107

5 <210> 2
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis orientalis

10 <400> 2
 Val Lys Leu Ser Gly Val Glu Leu Arg Arg Val Arg Met Pro Leu Val
 1 5 10 15
 Ala Pro Phe Arg Thr Ser Phe Gly Thr Gln Ser Glu Arg Glu Leu Leu
 20 25 30
 15 Leu Val Arg Ala Val Thr Pro Ala Gly Glu Gly Trp Gly Glu Cys Val
 35 40 45
 Ala Met Glu Ala Pro Leu Tyr Ser Ser Glu Tyr Asn Asp Ala Ala Glu
 50 55 60
 His Val Leu Arg Asn His Leu Ile Pro Ala Leu Leu Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Val Thr Ala His Lys Val Thr Pro Leu Leu Ala Lys Phe Lys Gly His
 85 90 95
 Arg Met Ala Lys Gly Ala Leu Glu Met Ala Val Leu Asp Ala Glu Leu
 100 105 110
 25 Arg Ala His Asp Arg Ser Phe Ala Ala Glu Leu Gly Ser Thr Arg Asp
 115 120 125
 Ser Val Ala Cys Gly Val Ser Val Gly Ile Met Asp Ser Ile Pro His
 130 135 140
 Leu Leu Asp Val Val Gly Gly Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Val Arg Ile
 30 145 150 155 160
 Lys Leu Lys Ile Glu Pro Gly Trp Asp Val Glu Pro Val Arg Gln Val
 165 170 175
 Arg Glu Arg Phe Gly Asp Asp Val Leu Leu Gln Val Asp Ala Asn Thr
 180 185 190
 35 Ala Tyr Thr Leu Gly Asp Ala Pro Leu Leu Ser Arg Leu Asp Pro Phe
 195 200 205
 Asp Leu Leu Leu Ile Glu Gln Pro Leu Glu Glu Asp Val Leu Gly
 210 215 220
 His Ala Glu Leu Ala Lys Arg Ile Arg Thr Pro Ile Cys Leu Asp Glu
 40 225 230 235 240
 Ser Ile Val Ser Ala Lys Ala Ala Asp Ala Ile Lys Leu Gly Ala
 245 250 255
 Cys Gln Ile Val Asn Ile Lys Pro Gly Arg Val Gly Gly Tyr Leu Glu
 260 265 270
 45 Ala Arg Arg Val His Asp Val Cys Ala Ala His Gly Ile Ala Val Trp
 275 280 285
 Cys Gly Gly Met Ile Glu Thr Gly Leu Gly Arg Ala Ala Asn Val Ala
 290 295 300
 Leu Ala Ser Leu Pro Gly Phe Thr Leu Pro Gly Asp Thr Ser Ala Ser
 50 305 310 315 320
 Gly Arg Phe Tyr Arg Thr Asp Ile Thr Glu Pro Phe Val Leu Asp Ala
 325 330 335
 Gly His Leu Pro Val Pro Thr Gly Pro Gly Leu Gly Val Thr Pro Ile
 340 345 350
 55 Pro Asp Leu Leu Asp Glu Val Thr Thr Glu Lys Ala Trp Ile Gly Ser
 355 360 365

Beispiele:

Nachweis der Racemaseaktivität des rekombinanten AAR-Enzyms

Das Substratspektrum der N-Acetylaminosäureracemase aus *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida* wurde mit dem unten beschriebenen Enzymassay getestet.

Der Assay setzte sich wie folgt zusammen:

	Puffer Tris/HCl	50 mM (pH 8,0)
10	Substrat	25 mM
	Cobaltchlorid	6 mM
	AAR	ca. 150 µg gereinigtes Protein
	Endvolumen	1 ml

Im Assay wurden enantiomerenreine Aminosäure-Derivate eingesetzt und die Bildung des entsprechenden Racemats im Polarimeter (Perkin-Elmer 241) verfolgt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C (heizbare Küvette) für 3 bis 12 Stunden.

Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365$ nm.

Tabelle 1: Auflistung der getesteten Substrate und der entsprechenden spezifischen Aktivität der AAR.

Substrat	Spezifische Aktivität
<i>N</i> -Carbamoyl-D-Met	155 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-D-Phe	20 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-L-Abs	15 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-L-Leu	20 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-L-Met	118 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-L-Tyr	62 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-L-Val	20 mU/mg

5

Die *N*-Acylaminosäureracemase aus *A. TS-1-60* besitzt mit *N*-Carbamoyl-D-Met als Substrat eine Aktivität von 100 mU/mg. Damit ist diese spezifische Aktivität um 35% niedriger, als die der Racemase aus *A. orientalis* subsp. *lurida*.

Patentansprüche:

1. Verwendung von N-Acetylaminosäureracemases (AAR) aus Amycolatopsis orientalis subspecies lurida in einem Verfahren zur Racemisierung von N-Carbamoyl-
5 aminosäuren.
2. Verwendung nach Anspruch 1 in einem Prozeß zur Herstellung von enantiomer angereicherten Aminosäuren oder deren Derivaten ausgehend von Hydantoinen oder N-Carbamoylaminosäuren.
- 10 3. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den Prozeß in einem Enzym-Membran-Reaktor durchführt.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung ist auf die Verwendung der N-Acetylaminosäureracemase aus Amycolatopsis orientalis subspecies lurida zur Racemisierung von N-
5 Carbamoylaminosäuren gerichtet.

Diese Verwendung erlaubt die 100%-ige Herstellung von optisch reinen Aminosäuren ausgehend von racemischen Hydantoinen in einem enzymatischen Gesamtverfahren.